

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2 0 0 4 年 7 月 2 3 日

出 願 番 号

Application Number:

特 願 2 0 0 4 - 2 1 6 3 7 7

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 2 1 6 3 7 7

出 願 人

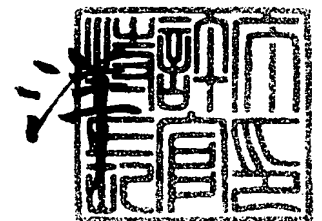
Applicant(s):

キヤノン株式会社

2 0 0 5 年 8 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】	付 訂 願
【整理番号】	0005915-01
【提出日】	平成16年 7月23日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	G01N 27/327
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】	久保 亘
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】	矢野 哲哉
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】	野本 毅
【特許出願人】	
【識別番号】	000001007
【氏名又は名称】	キヤノン株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100123788
【弁理士】	
【氏名又は名称】	宮崎 昭夫
【電話番号】	03-3585-1882
【選任した代理人】	
【識別番号】	100106297
【弁理士】	
【氏名又は名称】	伊藤 克博
【選任した代理人】	
【識別番号】	100106138
【弁理士】	
【氏名又は名称】	石橋 政幸
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	201087
【納付金額】	16,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【請求項 1】

酵素を導電性部材に固定した酵素電極において、

導電性部材と、

酵素と、

前記酵素との電子の受け渡しを行うための第 1 のメディエータと、

前記第 1 のメディエータとの電子の受け渡しを行うための第 2 のメディエータと、

前記酵素、前記第 1 のメディエータ及び前記第 2 のメディエータを前記導電性部材に固定するための担体と、を有し、

前記導電性部材が、前記担体と接触し、且つ、少なくとも前記第 1 のメディエータ及び前記第 2 のメディエータを介した酵素との電子の受け渡しを行うものである

ことを特徴とする酵素電極。

【請求項 2】

前記導電性部材が、互いに連通した多数の空隙を有し、かつこれらの空隙が直接に、または他の空隙を介して間接的に前記導電性部材の外部と連通している請求項 1 に記載の酵素電極。

【請求項 3】

前記第 1 のメディエータと前記第 2 のメディエータが、金属錯体、キノン類、複素環式化合物、ニコチンアミド誘導体及びフラビン誘導体から選ばれる少なくとも 1 種からなる請求項 1 または 2 に記載の酵素電極。

【請求項 4】

前記第 1 のメディエータの酸化還元電位が、前記第 2 のメディエータより負の電位であり、陽極または負極として用いられる請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の酵素電極。

【請求項 5】

前記第 2 のメディエータの酸化還元電位が、前記第 2 のメディエータより正の電位であり、陰極または正極として用いられる請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の酵素電極。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の酵素電極を、物質を検知するための検知部位として用いることを特徴とするセンサ。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の酵素電極を、アノード及びカソードの少なくとも一方として用いることを特徴とする燃料電池。

【請求項 8】

前記アノードとして、前記第 1 のメディエータの酸化還元電位が、前記第 2 のメディエータより負の電位である酵素電極を用いる請求項 7 に記載の燃料電池。

【請求項 9】

前記カソードとして、前記第 1 のメディエータの酸化還元電位が、前記第 2 のメディエータより正の電位である酵素電極を用いる請求項 7 または 8 に記載の燃料電池。

【請求項 10】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の酵素電極を反応極として用いることを特徴とする電気化学反応装置。

【請求項 11】

導電性部材に担体を介して酵素を固定した酵素電極の製造方法において、

導電性部材、酵素、前記酵素との電子の受け渡しを行うための第 1 のメディエータ、前記第 1 のメディエータとの電子の受け渡しを行うための第 2 のメディエータ及び担体を用意する工程と、

前記導電性部材に前記酵素、前記第 1 のメディエータ及び前記第 2 のメディエータを前記担体によって固定する工程と

を有することを特徴とする酵素電極の製造方法。

【発明の名称】 酵素電極、センサ、燃料電池、電気化学反応装置ならびに酵素電極の製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素電極に関し、より詳細には、導電性部材に担体、酵素、メディエータを固定化した酵素電極、酵素電極を用いたセンサ、燃料電池ならびに酵素電極の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生細胞内で作られる蛋白質性の生体触媒である酵素は、通常の触媒と比べて温和な条件下で強力に作用する。また酵素の作用を受けて化学反応を起こす物質である基質の特異性が高く、一般に各酵素は、一定基質の一定反応のみを触媒する。酵素のこれらの特性を、電極における酸化還元反応に理想的に利用できれば、低過電圧、高選択性の電極が作成可能となる。しかし、多くの酸化還元酵素の活性中心は、一般に、糖蛋白質の3次元構造の奥深いところに閉じ込められた形態で利用されている場合が多く、酸化還元酵素と電極との間で直接、高速の電子移動を行うことが困難であった。このため、酵素と電極間をメディエータと呼ばれる物質によって電子的に繋ぐ手法が提案されてきた。研究の初期段階では、酵素、およびメディエータは、実験系の簡便性、それぞれの移動の自由度の確保のため電解質溶液中に溶解されていたが、それらの有効利用、電極外への漏出防止、および、電極の連続、長期使用の要請にこたえるため、電極に固定化する手法が提案されてきた。酵素、メディエータを導電性部材に固定化する手法としては、吸着法、包括法、架橋法、共有結合法が挙げられる。これらの中でも、適当な化合物を用いて酵素、メディエータを導電性部材に固定化する、包括法、架橋法、共有結合法の三法は、吸着法と比較して、一般に酵素、メディエータの保持能が高く、系外への流出を防止し、酵素電極の繰返し使用を可能にする。さらに、この中でも包括法は、酵素、メディエータの保持容量が高いため好適に用いられる。

【0003】

酵素電極の性能を表現する重要な値のひとつとして、導電性部材の投影面積あたりの電流値である電流密度が挙げられる。この値が高いと、例えば、電流値の検知を原理とするセンサの場合には、検出感度の向上、測定部位の簡便化、検知部位の小型化を図ることができ、燃料電池の電極として用いる場合には、出力の向上を図ることができ、電気化学反応装置として使用する場合には、反応速度の向上を図ることができる、といった利点がある。この酵素電極の電流密度を向上させる手法としては、(1)単位時間に酵素一分子が変換する基質分子の数である酵素のターンオーバー数の増加、(2)酵素／メディエータ間の電子移動速度および効率の向上、(3)メディエータの電子輸送効率の向上、(4)メディエータ／導電性部材間の電子移動速度および効率の向上、そして(5)導電性部材の投影面積あたりの酵素担持量である酵素担持密度を高めること、などによって高くすることができる。

【0004】

前記項目(5)の実現のためには、酵素の保持容量の高い固定化方法が有利であり、前記の包括法が有力な選択肢である。包括法は、担体中に酵素、メディエータを包括し、導電性部材表面上に固定化する手法である。この包括法による酵素の固定化状態を模式的に図1に示す。この場合、導電性部材4(導電性基板)上に、酵素1及びメディエータ2が担体3中に包括されている。

【0005】

包括法においては、酵素／基質反応で酵素上に生じた電荷が、酵素の酸化還元中心から、担体中のメディエータに移動し、メディエータ間の電子ホッピングにより導電性部材近傍まで輸送され、最終的にメディエータと導電性部材間の電荷の授受により外部回路において検出される(図1に電荷の流れが矢印で示されている)。このため、酵素を酵素の専

有面積を導電性部材の表面積で割った量以上に固定しても、担体を通して電極と酵素間の電荷輸送が可能であるため、導電性部材の投影面積あたりの酵素の担持密度を向上させることができる。この包括法の例として米国特許第6,531,239号明細書（Hellerら）では、メディエータを分子内に含むポリマーによって、酵素を包括的に固定した酵素電極からなる燃料電池が開示されている。

【0006】

ここで、一般的に酵素とメディエータの電子移動速度は、酵素の酸化還元中心と、メディエータの電子移動距離の増加に従い指数関数的に低下する事が知られている。包括法の場合、酵素とメディエータは、距離、配向を持って配置されていないために、酵素／メディエータ間の電子移動は、酵素とメディエータがそれぞれのランダムな分子運動の結果、電子移動可能な距離にまで近接したときにはじめて起こるものと考えられる。このため、この酵素／メディエータ間の電子移動速度は、それぞれの分子運動に依存するため、必ずしも充分でなく、酵素電極の電流密度の制限要因となる可能性があった。

【0007】

一方、共有結合法の一例として、導電性基材上にメディエータを結合し、そのメディエータに酵素の酸化還元中心を結合、さらに、酸化還元中心を除いた酵素を、メディエータに結合した酸化還元中心に結合させる手法がある。共有結合法による酵素の固定状態を図2に模式的に示す。図2の例では、導電性部材4（導電性基板）の表面に担体としての化合物を介してメディエータ6及び酵素1が共有結合により固定されており、電荷の流れを矢印で示してある。

【0008】

KATZらは、J. Am. Chem. Soc. 1996年118巻10321-10322頁においてメディエータとしてピロロキロリンキノンに結合したフラビンアデニンジヌクレオチドに酸化還元中心を除去したアボグルコースオキシダーゼを再構成した酵素電極を報告している。この手法は、酵素の酸化還元中心に対し、メディエータを十分に速い電子移動が可能な距離に近接、配向を持って配置可能なため、酵素／メディエータ間の高速の電子移動が可能となる。この手法は、メディエータ、酵素対を導電性部材上に単分子様に結合しているため、酵素を単層以上に固定化させることが困難であるため、酵素の担持密度に限界があり、酵素電極の電流密度の向上に限界があった。

【特許文献1】米国特許第6,531,239号明細書

【非特許文献1】J. Am. Chem. Soc. 1996年118巻10321-10322頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、高密度で酵素を担持可能であり、かつ電流密度の向上を図ることができる酵素電極を提供するものである。また、本発明は、かかる酵素電極を利用したセンサ、電気化学的反応装置、燃料電池などを提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の酵素電極は、酵素を導電性部材に固定した酵素電極において、導電性部材と、酵素と、前記酵素との電子の受け渡しを行うための第1のメディエータと、前記第1のメディエータとの電子の受け渡しを行うための第2のメディエータと、前記酵素、前記第1のメディエータ及び前記第2のメディエータを前記導電性部材に固定するための担体と、を有し、前記導電性部材が、前記担体と接触し、且つ、少なくとも前記第1のメディエータ及び前記第2のメディエータを介した酵素との電子の受け渡しを行うものであることを特徴とする酵素電極である。

【0011】

本発明のセンサは、上記構成の酵素電極を、物質を検知するための検知部位として用いることを特徴とするセンサである。また、本発明の燃料電池は、上記構成の酵素電極を、

ノポート及びカノポートの少なくとも一方として用いることを特徴とする燃料電池である。
また、本発明の電気化学的反応装置は、上記構成の酵素電極を反応極として用いることを特徴とする電気化学反応装置である。

【0012】

一方、本発明の酵素電極の製造方法は、導電性部材に担体を介して酵素を固定した酵素電極の製造方法において、導電性部材、酵素、前記酵素との電子の受け渡しを行うための第1のメディエータ、前記第1のメディエータとの電子の受け渡しを行うための第2のメディエータ及び担体を用意する工程と、前記導電性部材に前記酵素、前記第1のメディエータ及び前記第2のメディエータを前記担体によって固定する工程と、を有することを特徴とする酵素電極の製造方法である。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、酵素を導電性部材に安定に固定化することが可能であり、また、導電性部材の実効表面積当たりの酵素担持密度を高くすることが可能であり、さらに、酵素との間で高速の電子移動を行うことが可能な第1のメディエータと第1のメディエータと導電性部材間の電荷輸送を行う第2のメディエータを使用することで、酵素と高速の電子移動を行うことが可能であり、その結果、酵素電極の安定性、電流密度を向上させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

次に、本発明の好ましい実施の形態について詳細に説明する。

【0015】

本発明の好ましいひとつの形態における酵素電極は、酵素と、酵素との電子の受け渡しを行うための第1のメディエータの少なくとも一種類と、第1のメディエータとの電子の受け渡しを行うための第2のメディエータの少なくとも一種類と、酵素、前記第1のメディエータ及び前記第2のメディエータを固定化するための担体と、担体を接触し、且つ、前記第1のメディエータまたは前記第2のメディエータとの電子の受け渡しを行うための導電性部材とを有することを特徴とする。酵素と導電性部材の電子の受け渡しは、少なくとも第1のメディエータ及び第2のメディエータを介して行われ、更に、酵素と導電性部材の間のメディエータを介さない電子の受け渡し、並びに、第1のメディエータと導電性部材の間の第2のメディエータを介さない電子の受け渡しの一方、あるいは両方が生じているものであってもよい。

【0016】

この電極は、酵素の固定化に担体を使用することで、酵素を導電性部材に安定に固定化することが可能であり、また、導電性部材の実効表面積当たりの酵素担持密度を高くすることが可能であり、さらに、酵素との間で高速の電子移動を行うことが可能な第1のメディエータと第1のメディエータと導電性部材間の電荷輸送を行う第2のメディエータを使用することで、酵素と高速の電子移動を行うことが可能であり、その結果、酵素電極の安定性、電流密度を向上させることができる。本発明における第1のメディエータは、前記第2のメディエータと比較して、酵素との間の電子移動反応速度が高いものであり、その結果、第2のメディエータのみを使用する酵素電極と比較して、高い電流密度を得ることができる。一方、本発明における第2のメディエータは、前記第1のメディエータと比較して電荷の輸送能が高い、かつ、または、電極との間の電子移動反応速度が高いものであり、その結果、第1のメディエータのみを使用する酵素電極と比較して高い電流密度を得ることができる。本発明における、酵素、第1のメディエータ、第2のメディエータ、担体の配合割合の最適値は、第一のメディエータの割合が酵素との間での電子移動が充分に行われる程度に高く、第二のメディエータの割合が酵素／導電性部材間の電荷輸送が充分に行われる程度に高く、担体の割合が酵素、メディエータを充分に保持できる程度に高く、かつ、酵素の担持密度が充分高く保たれる必要があり、これらの相関により決定される。この例としては、酵素の重量を1として第一のメディエータの重量が0.0001から

1、より好ましくは、0.1から0.3、第1のメディエータの重量が0.01から0.1、より好ましくは、0.01から0.05、第2のメディエータの重量が0.01から0.1、より好ましくは、0.01から0.05、また担体の重量が0.05から3、より好ましくは、0.1から1が挙げられる。

【0017】

図3に、本発明の酵素電極における酵素、第1及び第2のメディエータの固定状態の一例を示す。この例では、導電性部材（導電性基板）4の表面の担体からなる層に、酵素1、第1のメディエータ8及び第2のメディエータ9が包括されている。電子の流れの一例を矢印で示してある。

【0018】

また、この酵素電極は、酵素との間で高速の電子移動を行うことが可能な第1のメディエータは、第1のメディエータと導電性部材間の電荷輸送を行う第2のメディエータ間の効率的な電子移動を確保するために、この酵素電極を陽極または陰極として用いる場合に、第1のメディエータの酸化還元電位が、前記第2のメディエータより負の電位であること（図4）、また、陰極または正極として用いる場合には、第1のメディエータの酸化還元電位が、前記第2のメディエータの酸化還元電位より正の電位であること（図5）、を特徴とする。

【0019】

本発明の好ましいひとつの形態であるセンサは、酵素電極を物質を検知するための検知部位として用いることを特徴とする。代表的な構成としては、酵素電極を作用電極として、参照電極及び対極とセットで使用して、酵素電極で（電極に固定した酵素の機能により）検知可能な電流を検知して、これらの電極が接している液体中の物質の検出に利用する構成を挙げることができる。具体例として図6に示す構成のセンサを挙げることができる。図6のセンサは、アノード（陽極）15、白金線電極16、また必要に応じて、銀塩化銀参照電極17を有して構成され、それぞれの電極にはリード線18～20が配線され、ポテンショスタットと接続されている。このセンサを、蓋13で密閉可能なウォータージャケットセル12内の電解質14の貯溜領域に配置する。作用電極に電位を印加して定常電流を測定することで、電解質中での基質の検出を行なうことができる。なお、不活性ガス雰囲気での測定が必要な場合は、ガストューブ23の外部末端のガス吹き込み口23から窒素などの不活性ガスを導入する。また、温度は、温調水流入口24及び温調水排出口25を利用した温度調節用の液体の供給により行うことができる。

【0020】

本発明にかかるセンサの構成は、酵素電極での検知が可能であるものであれば特に制限されない。このセンサは、電極反応の触媒として用いる酵素に特有の基質の高い選択性に加え、担体と複数のメディエータを用いた酵素電極による、高い安定性、電流密度によって、センサの繰返し、長期使用、検出装置の簡略化、測定部位の小型化が可能となる。この場合、酵素電極は、板状や層状として単層で、あるいは2以上の層の積層構造として用いることができる。このセンサは、酵素電極に用いた酵素の基質に対応する物質の検知を行うことができ、その用途の例としては、グルコースセンサ、フルクトースセンサ、ガラクトースセンサ、アミノ酸センサ、アミンセンサ、コレステロールセンサ、アルコールセンサ、乳酸センサ、酸素センサ、過酸化水素センサ等が挙げられ、より具体的な応用例としては、血中のグルコース濃度や、乳酸濃度を測定するセンサ、果物の糖度を測定するセンサ、呼吸気中のアルコール濃度を測定するセンサ等が挙げられる。

【0021】

本発明の好ましいひとつの形態である燃料電池は、酵素電極をアノードまたはカソードの少なくとも一方として用いることを特徴とする。この場合にも、酵素電極は、板状や層状として単層で、あるいは2以上の層の積層構造として用いることができる。更に、積層構造とした場合に、積層方向にアノードとカソードを所定の配列に配置してもよい。代表的な構成としては、燃料となる物質を含む電解液を貯溜し得る反応槽と、反応槽中に所定の間隔で配置されたアノードとカソードとを有し、このアノード及びカソードの少なくとも一方に本発明にかかる酵素電極を用いた構成を挙げることができる。なお、この燃料電

他は電解液を補給のするいは相対させるノードで、電解液の補給で相対しないノードとすることが出来る。この燃料電池は、酵素電極が使用できるものであれば、燃料の種類、構造、機能などは制限されない。この際、酵素電極の触媒として用いられている酵素は、一般に電気化学の分野で用いられている、貴金属触媒（例えば白金）と比較して、高い基質選択性を有するため、一方の電極と、他方の電極における反応物質を隔離する機構を必要とせず、その結果、デバイスを簡素化することが可能となる。この燃料電池は、電極反応の触媒として用いる酵素に特有の高い触媒作用によって、物質を低い過電圧で酸化還元できることにより、高い駆動電圧を得ることが可能であり、担体と複数のメディエータを用いた酵素電極による、高い安定性、電流密度によって、長寿命、高出力化が可能となる。

【0022】

燃料電池の一例を図7に示す。この燃料電池のセルの構成は先に図6に示したセンサでの基質測定用装置とほぼ同一であり、同一部材には同じ番号を付している。図6で示したセンサの代わりに、アノード15とカソード27を多孔質ポリプロピレンフィルムを介して積層した構成の電極ユニットを用い、チューブ23を介して酸素ガスをセル内に導入して、燃料電池として作用させる。

【0023】

本発明の好ましいひとつの形態である電気化学反応装置は、電極反応の触媒として用いる酵素に特有の基質の高い選択性、触媒能に加え電気化学反応の特徴である、反応の定量性を得ることが可能で、その結果、高選択的、高効率で定量的に制御可能であり、担体と複数のメディエータを用いた酵素電極による、高い安定性、電流密度によって、長寿命、高出力化が可能となる。この場合にも、酵素電極は、板状や層状として単層で、あるいは2以上の層の積層構造として用いることができる。代表的な構成としては、一対の電極と必要に応じて設けられた参照電極とを反応液を貯留し得る反応層内に配置して、一対に電極間に電流を流して、反応液中の物質に電気化学的反応を起させて目的とする反応生成物、分解物などを得る構成を挙げることができ、一対の電極の少なくとも一方に本発明にかかる酵素電極を用いる。反応液の種類や反応の条件などにかかる装置構成は、酵素電極が利用できるものであれば特に限定されない。例えば、酸化還元反応による反応生成物の所得や、目的とする分解物の取得などに利用できる。この電気化学反応装置は、酵素電極に用いた酵素の基質に対応する物質の反応を選択的に行うことができ、その用途の例としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、アミノ酸、アミン、コレステロール、アルコール、乳酸、の酸化や酸素、過酸化水素の還元反応が挙げられ、より具体的な応用例としては、エタノールの存在下、コレステロールの選択的酸化、酸素の低過電圧での還元反応等が挙げられる。

【0024】

本発明において担体は、少なくとも酵素を導電性部材に固定化するものである。例としては、(1)高分子化合物、(2)無機化合物、及び(3)有機化合物であり、共有結合性の結合部を分子内に有し、少なくとも酵素と導電性部材を結合するもの(酵素同士を結合させる機能が付加されていてもよい)、を挙げることができ、これら三種のうち少なくとも1つを用いることができる。これらの担体は、酵素を電極に固定するために電極の使用条件下で酵素が持つ表面電荷と反対の電荷を有していることが好ましい。この担体は、酵素を共有結合、静電的相互作用、空間的閉じ込め等により保持するものであってよく、その結果、電極上、または、電極の粘結に用いるバインダーポリマー等への物理吸着による酵素の保持方法と比較してより安定、かつ高密度に酵素を保持することが可能となる。この高分子の例として、導電性高分子の例としては、ポリアセチレン類、ポリアリーレン類、ポリアリーレンビニレン類、ポリアセン類、ポリアリールアセチレン類、ポリジアセチレン類、ポリナフタレン類、ポリピロール類、ポリアニリン類、ポリチオフェン類、ポリチエニレンビニレン類、ポリアズレン類、ポリイソチアナフテン類、その他の高分子の例としては、ポリスチレンスルホン酸、ポリビニル硫酸、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリマレイン酸、ポリフマル酸、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン塩酸塩、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロリド、

ホウヒールヒュン、ホウヒールイミノール、ホウヒン、ノイマシツホウ酸、ノイ酸、ペクチン、シリコーン樹脂、セルロース、アガロース、デキストラン、キチン、ポリスチレン、ポリビニルアルコール、ナイロンが挙げられる。この無機化合物の例としては、In、Sn、Zn、Ti、Al、Si、Zr、Nb、Mg、Ba、Mo、W、V、Srから選択される少なくとも1つの元素を含む金属カルコゲナイド化合物が挙げられる。この有機化合物であり共有結合性の結合部を分子内に有し、酵素と導電性部材かつ、または、酵素と酵素を結合するものの例としては、少なくともヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、ヒドラジノ基、チオシアネート基、エポキシ基、ビニル基、ハロゲン基、酸エステル基、リン酸基、チオール基、ジスルフィド基、ジチオカルバメート基、ジチオホスフェート基、ジチオホスホネート基、チオエーテル基、チオ硫酸基、チオ尿素基のうちから選択される少なくとも1つの官能基を含む化合物があげられる。代表例としては、ゲルタルアルデヒド、ポリエチレングリコールジグリシデルエーテル、塩化シアヌール、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ジメチルー3、3'-ジチオプロピオニミデート塩酸塩、3、3'-ジチオビス（サルホスクシンイミジルプロピオネート）、シスタミン、アルキルジチオール、ピフェニレンジチオール、ベンゼンジチオールが挙げられる。

【0025】

本発明において導電性部材は、酵素、メディエータおよびそれらを固定するための担体を保持し、酵素電極の使用時には、外部回路と電気的に接続されるものである。この導電性部材は、導電性を有し、保存、測定時に十分な剛性を有し、電極が使用される条件において十分な電気化学安定性を有する材料であれば用いることができる。導電性部材に用いられる材料の例としては、金属、導電性高分子、金属酸化物、炭素材料を挙げることができる。この金属の例としては、例としては、Au、Pt、Ag、Co、Pd、Rh、Ir、Ru、Os、Re、Ni、Cr、Fe、Mo、Ti、Al、Cu、V、Nb、Zr、Sn、In、Ga、Mg、Pb、Si、Wのうち少なくとも一種の元素を含むものがあげられ、これらは、合金であっても、めっきを施したものであってよい。この導電性高分子の例としては、ポリアセチレン類、ポリアリーレン類、ポリアリーレンビニレン類、ポリアセン類、ポリアリールアセチレン類、ポリジアセチレン類、ポリナフタレン類、ポリピロール類、ポリアニリン類、ポリチオフエン類、ポリチエニレンビニレン類、ポリアズレン類、ポリイソチアナフテン類のうち少なくともひとつの化合物を含むものが挙げられる。この金属酸化物は、他の導電性材料によって導電性を向上、もしくは、付与されていてよい。金属酸化物の例としては、In、Sn、Zn、Ti、Al、Si、Zr、Nb、Mg、Ba、Mo、W、V、Srのうち、少なくとも一種の元素を含むものがあげられる。この際の導電性材料の例としては、金属、導電性高分子、炭素材料が挙げられる。この炭素材料は、他の導電性材料によって導電性を向上、もしくは、付与されていてよい。炭素材料の例としては、グラファイト、カーボンブラック、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、フラーレン化合物およびこれらの誘導体が挙げられる。

【0026】

導電性部材は、互いに連通した多数の空隙を有し、かつこれらの空隙が直接に、または他の空隙を介して間接的に前記導電性部材の外部と連通している構造を有し、空隙内に酵素、第1及び第2のメディエータを固定できるものが好ましい。かかる導電性部材は、外部と連通する多数の空隙が内部に形成されたものであり、空隙を仕切る壁が構成材料から一体的に形成されている構造や、空隙を仕切る壁を構成する材料同士が強固に結合しているものが好ましい。このような導電性部材の構成材料としては、先に挙げた導電性の金属、高分子、金属酸化物及び炭素材料など用いることができる。この導電性部材の有する多数の空隙は、一次元、二次元、もしくは三次元的に連結したもので、これらの連結形態の2以上が混在しているものであってもよい。一次元に連結した空隙の例としては柱状の空隙、二次元に連結した空隙の例としては、網状の空隙、三次元に連結した空隙の例としては、スポンジ状、微小粒子を接合した後に生じる空隙、またそれらをテンプレートにして作成した構造材料の空隙が挙げられる。これらの空隙は、酵素が導入できる程度、かつ、

または基質の流動、拡散が十分に行われる程度に小さく、投影面積に対する実効表面積の比が十分にえられる程度に小さい必要がある。空隙の平均径の例としては、5 nmから、500 μ mの範囲、より好ましくは、10 nmから10 μ mが挙げられる。また、空隙を有する導電性部材の厚さは、酵素が導電性部材の深部まで均一に導入できる程度、かつ、または基質の流動、拡散が十分に行われる程度に小さく、導電性部材の投影面積に対する実効表面積の比が十分にえられる程度に大きい必要があり、この空隙を有する導電性部材の厚さの例としては、100 nmから1 cm、より好ましくは、1 μ mから5 mmが挙げられる。この空隙を有する導電性部材の投影面積に対する実効表面積の比は、投影面積に対する実効表面積の比が十分にえられる程度に大きい必要があり、その例としては、10倍以上、より好ましくは、100倍以上が挙げられる。また、この空隙を有する導電性部材の気孔率は、導電性部材の投影面積に対する実効表面積の比が十分にえられる程度に、かつ、または、十分な酵素、担体量が導入できる程度に、かつ、または、基質の流動、拡散が充分に行われる程度に大きく、十分な機械的強度が得られる程度に小さい必要があり、その例としては、20%以上99%以下、より好ましくは、30%以上98%以下が挙げられる。また、酵素固定後の気孔率は、電解液の流動、基質の拡散が充分行われる程度に大きく、担体、酵素の高い充填率が得られる程度に小さい必要があり、その例としては、15%以上98%以下、より好ましくは、25%以上95%以下が挙げられる。

【0027】

多数の空隙を有する金属製導電性部材の形成材料としては、発泡金属、電析金属、電解金属、焼結金属、繊維状金属、あるいは、これらの内の単数、もしくは、複数の種別に該当する材料が挙げられる。また、空隙を有する導電性高分子の製造方法の例としては、空隙となる部分を構成する鋳型としての物質を導電性高分子中に配置して所定の形状に成形した後、鋳型としての物質を除く方法；導電性高分子の前駆体中に空隙となる部分の鋳型としての物質を含有させ、前駆体を重合させて高分子とした後、鋳型としての物質を除く方法；空隙となる部分を構成する鋳型となる粒子からなる層を形成し、その粒子間の空隙に高分子を充填して層を形成し、この層から粒子を除去する方法；空隙となる部分を構成する鋳型となる粒子からなる層を形成し、その粒子間の空隙に高分子の前駆体を充填して層を形成し、前駆体を重合させて高分子層としてから粒子を除去する方法；など、多孔質樹脂の製造に利用されて方法を挙げることができる。

【0028】

一方、金属酸化物からなる多数の空隙を有する導電性部材は、電析、スパッタリング、焼結、化学気相成長法(CVD)、電解およびこれらの組合せがなどの方法により得ることができる。また、グラファイト、カーボンブラック、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、フラーレン化合物およびこれらの誘導体をからなる繊維、粒子などを所定の形状に成形してから焼結することで多数の空隙を有する導電性部材を得ることができる。

【0029】

本発明においてメディエータは、酵素／メディエータ／導電性部材間の電子の受け渡しを促進させるものである。このメディエータは、担体、かつ、または、酵素に化学結合していてもよい。例としては、金属錯体、キノン類、複素環式化合物、ニコチンアミド誘導体、フラビン誘導体が挙げられる。この金属錯体としては、中心金属にOs、Fe、Ru、Co、Cu、Ni、V、Mo、Cr、Mn、Pt、Rh、Pd、Mg、Ca、Sr、Ba、Ti、Ir、Zn、Cd、Hg、Wの内から少なくとも1種類の元素を含むものを用いることができる。また、この金属錯体の配位子としては、窒素、酸素、リン、硫黄、炭素原子を含有し、少なくともこれらの原子を介して中心金属と錯体形成するもの、または、シクロペンタジエニル環を骨格として有する物が挙げられる。例としては、ピロール、ピラゾール、イミダゾール、1、2、3-または1、2、4-トリアゾール、テトラゾール、2、2'-ビイミダゾール、ピリジン、2、2'-ビチオフエン、2、2'-ビピリジン、2、2':6'、2''-ターピリジン、エチレンジアミン、ポルフィリン、フタロシアニン、アセチルアセトン、キノリノール、アンモニア、シアンイオン、トリフェニルホスフィンオキサイドおよびそれらの誘導体が挙げられる。キノン類の例としては、キノ

ン、ハニノヤノン、ノンドノヤノン、リノトヤノン、ヒロロヤノンヤノン（1000）、テトラシアノキノジメタン、およびそれらの誘導体が挙げられる。複素環式化合物の例としては、フェナジン、フェノチアジン、ピオローゲン、およびそれらの誘導体が挙げられる。ニコチンアミド誘導体の例としては、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ酸が挙げられる。フラビン誘導体の例としては、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）が挙げられる。

【0030】

本発明において酵素は、酸化還元反応を触媒する酵素であり、複数の酵素の組合せであってもよい。例としては、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、D-またはL-アミノ酸オキシダーゼ、アミンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、L-乳酸オキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、チトクロムオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロールデヒドロゲナーゼ、17Bヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、エストラジオール17Bデヒドロゲナーゼ、アミノ酸デヒドロゲナーゼ、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、グルタチオンレダクターゼ、NADH-チトクロムb5レダクターゼ、NADPH-アドレノキシシンレダクターゼ、チトクロムb5レダクターゼ、アドレノドキシシンレダクターゼ、硝酸レダクターゼが挙げられる。

【0031】

また、この酵素の基質としては、それぞれの酵素に対応する化合物が挙げられ、有機物、酸素、過酸化水素、水、硝酸イオンが挙げられる。また、この有機物の例としては、糖類、アルコール類、カルボン酸類、キノン類、ニコチンアミド誘導体、フラビン誘導体が挙げられる。また、この糖類には、セルロース、デンプン糖の多糖も含まれていてよい。

【0032】

本発明において担体を固定する工程は、導電性部材に担体を均一に固定化することが重要である。この担体を固定化する工程には、酵素を固定化する工程かつ、または、メディアータを固定化する工程が同時に含まれていてよい。この担体を固定する工程の例としては、担体の溶液、または分散液に、空隙を有する導電性部材を浸漬する工程、もしくは、担体の溶液、または分散液を、空隙を有する導電性部材に塗布、注入、スプレーする工程、担体の前駆体の溶液、または、分散液に空隙を有する導電性部材を浸漬、もしくは、担体の前駆体の溶液、または分散液を空隙を有する導電性部材に塗布、注入、スプレーする工程を行い、その後、前駆体の加水分解、重合、架橋反応を行うことで、固定化する工程が挙げられる。

【実施例】

【0033】

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明の方法は、これらの実施例のみに限定されるものではない。

【0034】

はじめに、本発明に用いる部材の調製法を記述する。

（調製例1）

市販のシリカコロイド分散液（日産化学、平均粒径100nm）をエタノール置換し、その分散溶液中に洗浄した金板（1cm角、厚さ0.3mm、ニラコ）を立て、30℃でエタノールを蒸発させることで、シリカ球からなる多孔質膜を調製する。この工程を複数回行うことで、シリカ球からなる多孔質膜の膜厚を増大させる（膜厚100μm）。200℃で3時間加熱した後、エタノールで洗浄し、0.1Mの3、4-エチレンジオキシチオフェン、0.1M過塩素酸リチウムのアセトニトリル溶液中、この多孔質膜を作用極に

、白金対極、銀／塩化銀参照電極を用いた二極セルで、ホロンジコヘノリドを用いて、 $1.1\text{ V (vs Ag/AgCl)}$ の電位で電解重合を行う。重合時間は、電解電流のプロファイルを参照して、シリカ球多孔質膜の膜厚と同程度になるよう、電解時間を調整した。電解重合後、 20% フッ化水素酸溶液中に2日間浸漬、シリカ球を除去し、導電性ポリ(3、4-エチレンジオキシチオフェン)からなる多数の空隙を有する導電性部材(膜厚 $100\text{ }\mu\text{m}$)を調製する。

(調製例2)

針状のインジウムスズ酸化物(ITO、住友金属鉱山、 $30\text{--}100\text{ nm}$ 長、アスペクト比10以上)をタービノールに分散し、エチルセルロースで粘度を調整し、ITOペーストを調製する。洗浄済の金板(1 cm 角、厚さ 0.3 mm 、ニラコ)にスクリーン印刷法で、ITOペーストを印刷し、 450°C で1時間焼結し、ITOの多孔質焼結電極(膜厚 $100\text{ }\mu\text{m}$)を調製する。さらにこの上にプラズマ化学気層合成(CVD)を行い約 10 nm のITOを堆積させ、ITOからなる多数の空隙を有する導電性部材を調製する。

(調製例3)

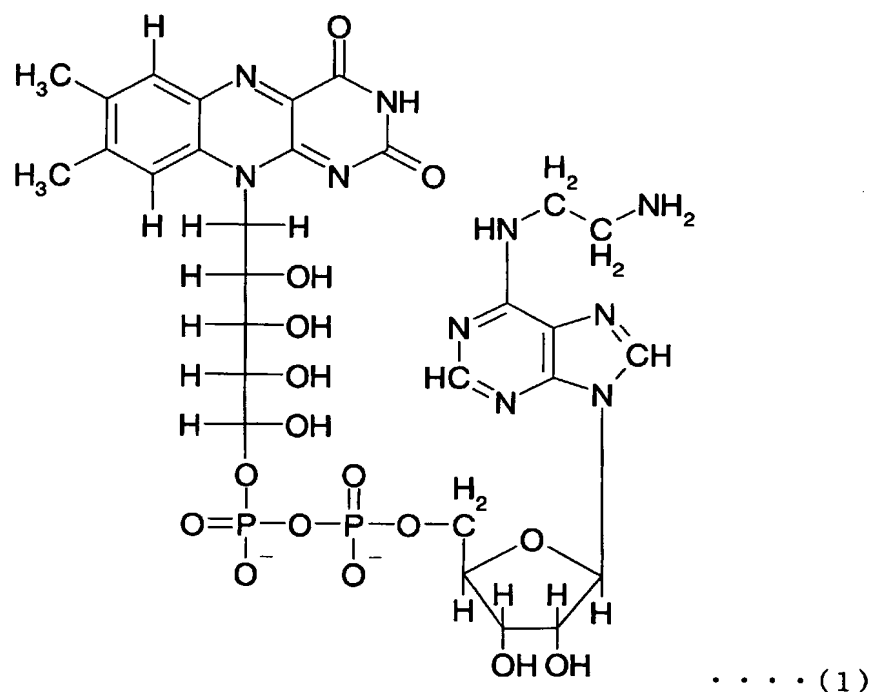
天然黒鉛粒子(粒径 $11\text{ }\mu\text{m}$)に黒鉛粒子に対して $10\text{ wt.}\%$ のポリフッ化ビニリデンとN-メチル-2-ピロリドンを混合し、ポリフッ化ビニリデンを溶解させる。さらに、混練、調製した黒鉛のペーストを直径 11.3 mm 、厚さ 0.5 mm の膜に成型し 60°C で乾燥させた後、 240°C で加熱、さらに 200°C で真空乾燥し、互いに結合した多数のグラファイト粒子間に多数の空隙を有する導電性部材を調製する。

(調製例4)

化学式(1)に示す $\text{N}^6\text{-(2-アミノエチル)FAD}$ の調製法について記述する。FADの 10% 水溶液に等モルのエチレンジアミンを加え、 pH を $6\text{--}6.5$ に調整し、 50°C で6時間反応させる。反応溶液を冷却し、氷浴中のエタノールに加え沈殿を回収する。回収した沈殿を、アニオン交換クロマトグラフィー、逆層高速クロマトグラフィーにかけ、精製された化学式(1)に示す $\text{N}^6\text{-(2-アミノエチル)FAD}$ を得る。

【0035】

【化1】



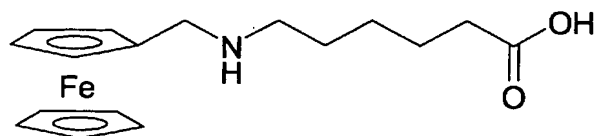
【0036】

(調製例5)

化学式(2)に示すフェロセン誘導体の調製法を記述する。200 mLのDMFに、4.7 gの6-アミノカプロン酸を溶解させ、100 mLのDMFに溶解させた2.1 gのフェロセンカルボアルデヒドを加え、100℃で1時間攪拌する。1 gの水素化ホウ素ナトリウム飽和水溶液を加え室温でさらに1時間攪拌し、溶媒を減圧留去、ジクロロメタン／メタノール＝10／1溶媒でシリカカラムをかけることで、化学式(2)に示すフェロセン誘導体化合物を得る。化合物の同定は、 $^1\text{H-NMR}$ で行われる。

【0037】

【化2】



・・・(2)

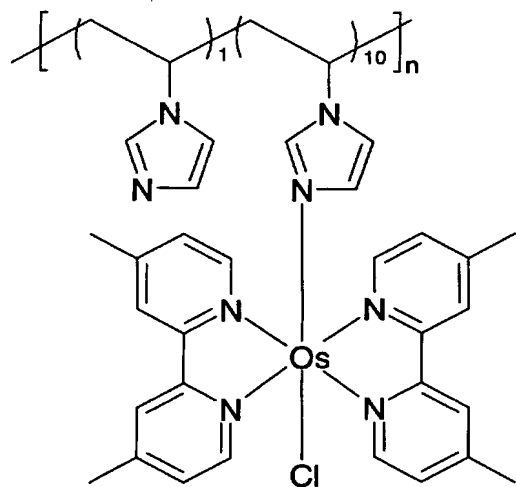
【0038】

(調製例6)

化学式(3)に示すオスミウム錯体包含ポリマーの合成法を記述する。6 mLの1-ビニルイミダゾールに、0.50 gのアゾビスイソブチロニトリルを加え、アルゴン雰囲気下70℃で2時間反応をおこなう。反応用液を空冷し、生じた沈殿物をメタノールに溶解させ、強攪拌中のアセトンに滴下し、沈殿を濾取し、ポリ-1-ビニルイミダゾールを得る。一方、1.2 gの4,4'-ジメチル-2,2'-ビピリジン、1.4 gの六塩化オスミウム酸アンモニウムに、5 mLのエチレングリコールを加え窒素雰囲気下140℃で24時間反応をおこなう。反応溶液を空冷した後、不純物を濾取、濾液を減圧留去し、 $\text{Os}(4,4'\text{-ジメチル-2,2'-ビピリジン})_2$ ジクロライド塩化物塩を得る。0.13 gの $\text{Os}(4,4'\text{-ジメチル-2,2'-ビピリジン})_2$ ジクロライド塩化物塩と0.20 gのポリビニルイミダゾールを、200 mLのエタノールに加え、窒素雰囲気下3日間還流をおこなう。濾液を濾過した後、強攪拌中の1 Lジエチルエーテル中に滴下、生成した沈殿物を回収、乾燥し、化学式(3)に示すオスミウム錯体ポリマーを得る。化合物の同定は、元素分析で行われる。

【0039】

【化3】



・・・(3)

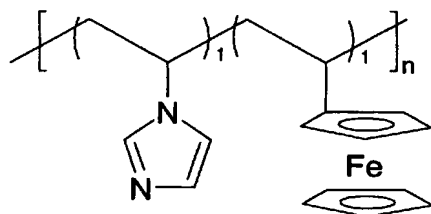
【 0 0 4 0 】

(調製例 7)

化学式 (4) に示す、含フェロセンポリマーの調製法について記述する。3.0 mL のトルエンに 1.6 g の 1-ビニルイミダゾール、0.71 g の 1-ビニルフェロセン、6.2 mg のアゾビスイソブチロニトリルを加え、アルゴン雰囲気下 70℃ で 2 時間反応をおこなう。反応溶液を空冷し、反応溶液を 1 L のジエチルエーテル中に滴下し、沈殿を濾取し、化学式 (4) にしめす含フェロセンポリマーを得る。

【 0 0 4 1 】

【化 4】



... (4)

【 0 0 4 2 】

(調製例 8)

化学式 (5) に示す、錯体ポリマーの合成法を記述する。100 g の 40% グリオキサール水溶液に氷浴中、370 mL の濃アンモニア水を滴下、45℃ で 24 時間攪拌し、空冷後沈殿物を濾過、50℃ で 24 時間真空乾燥し、2,2'-ビイミダゾールを得る。同定は、シリカゲルの薄層クロマトグラフィー (10% メタノール / 90% クロロホルム) で行う。100 mL の N,N'-ジメチルホルムアミド (DMF) の 2,2'-ビイミダゾール (4.6 g) 溶液に氷浴中、窒素雰囲気下 2.7 g の水素化ナトリウムを加え、室温で 1 時間攪拌後、12.8 g のパラトルエンスルホン酸メチルの DMF 溶液 5 mL を 20 分かけて滴下、室温で 4 時間攪拌する。真空下、50℃ で溶媒を留去し、残留した固体を 50 mL ヘキサンで洗浄、160℃ で真空乾燥し、N,N'-ジメチル-2,2'-ビイミダゾールの無色透明の結晶を得る。同定は、¹H-NMR で行う。10 g の 2,2'-ビイミダゾールの DMF 溶液 100 mL に、氷浴中、窒素雰囲気下 3.3 g の水素化ナトリウムを加え、氷浴で 1 時間攪拌後、ヨウ化メチル (4.6 mL) を滴下、氷浴下 30 分攪拌、さらに室温で 12 時間攪拌する。反応溶液を 300 mL の酢酸エチルに注ぎ、濾過した後、溶媒を減圧、真空留去し、残留物を沸騰酢酸エチルに溶かし、濾過する。濾液を再び酢酸エチル中で煮込み、300 mL のヘキサンで飽和させる。冷凍庫で 12 時間静置し、結晶を成長させ、吸引濾過で回収し、酢酸エチル / ヘキサン溶媒から再結晶させ、N-メチル-2,2'-ビイミダゾールを得る。同定は、¹H-NMR で行う。80 mL の DMF に 1 g の N-メチル-2,2'-ビイミダゾールを溶解させ、窒素雰囲気下 0.32 g の水素化ナトリウムを加え、氷浴で 1 時間攪拌後、2.5 g の N-(6-プロモヘキシル) フタルイミドと 1.0 g のヨウ化ナトリウムを徐々に加え、窒素雰囲気下、80℃ で 24 時間攪拌する。室温まで冷却し、150 mL の水に注ぎ、150 mL の酢酸エチルで 2 度抽出し、塩化ナトリウム水溶液で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧留去を行う。中性のアルミナカラム、(酢酸エチル / ヘキサン 10-40%) で精製し、N-メチル-N'-(6-フタルイミドヘキシル)-2,2'-ビイミダゾールを得る。同定は、¹H-NMR で行う。

【 0 0 4 3 】

25 mL のエタノールに 2.5 g の N-メチル-N'-(6-フタルイミドヘキシル)-2,2'-ビイミダゾールを溶解させ、水素化ヒドラジン 0.39 g を加え、2 時間還流、室温まで冷却し、濾過後、シリカゲルカラムにエタノールで、その後 10% アンモニアのアセトニトリル溶液で生成物を回収、減圧留去し、N-(6-アミノヘキシル)-N

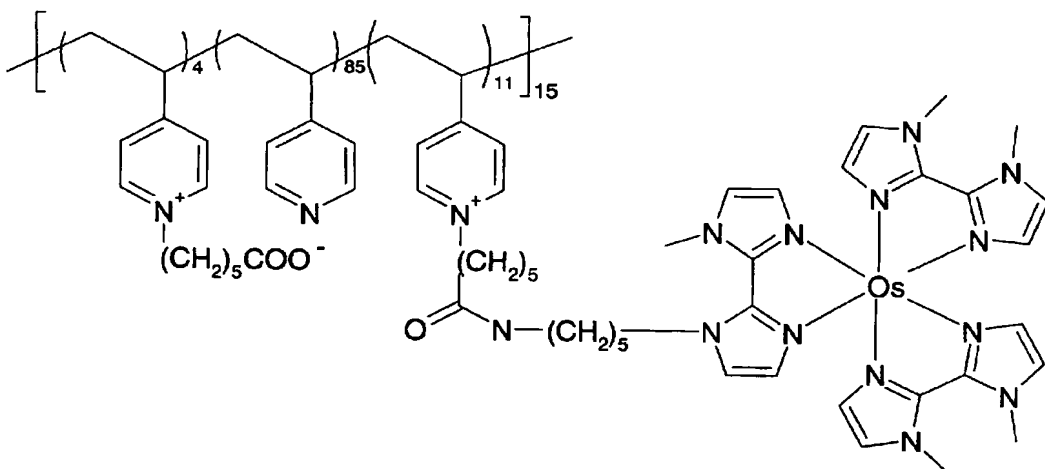
N-メチル-2,2'-バイイミダゾールを得る。同定は、 $^1\text{H-NMR}$ で行う。1.1 g の N-メチル-2,2'-バイイミダゾールと 1.4 g 六塩化オスミウム酸アンモニウムを 40 mL のエチレングリコールに溶かし、窒素雰囲気下 140°C で 24 時間攪拌、0.8 g の N-(6-アミノヘキシル)-N'-メチル-2,2'-バイイミダゾールを溶解させたエチレングリコール 5 mL を加え、さらに 24 時間攪拌後、室温に冷却、濾過する。濾液を 200 mL の水で薄め、40 mL の陰イオン交換樹脂 (DOWEX (登録商標) 1X4) を加え、空气中で、24 時間攪拌した。溶液を 10.2 g の六フッ化リン酸アンモニウムの水溶液 150 mL に徐々に注ぎ、沈殿物を吸引ろ過し、アセトニトリルに溶かし、六フッ化リン酸アンモニウム水溶液で再沈殿させ、水洗し、45°C で 24 時間真空乾燥し、オスミウム (III) (N,N'-ジメチル-2,2'-バイイミダゾール)₂ (N-(6-アミノヘキシル)-N'-メチル-2,2'-バイイミダゾール) 六フッ化リン酸塩をえる。同定は、元素分析でおこなう。

【0044】

20 g ポリビニルピリジン (平均分子量 15 万)、5.6 g の 6-プロモヘキサン酸を 150 mL の DMF に加え、攪拌機で 90°C、24 時間攪拌、室温まで冷却し、強攪拌中の酢酸エチル 1.2 L にゆっくりと注ぐ。溶媒をデカンテーションし、固体をメタノールに溶解させ、濾過、減圧留去で溶媒を 200 mL 程度に減らしてから、1 L のジエチルエーテル中で再沈殿を行い、50°C で 24 時間真空乾燥、さらに固体を粉碎し、48 時間乾燥し、ポリ(4-(N-(5-カルボキシペンチル)ピリジニウム)-コ-4-ビニルピリジン)を得る。0.52 g のポリ(4-(N-(5-カルボキシペンチル)ピリジニウム)-コ-4-ビニルピリジン)を 10 mL の DMF に分散させ、0.18 g の O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (TSTU) を加え、15 分間攪拌し、0.1 mL の N,N-ジイソプロピルエチルアミンを加え、8 時間攪拌し、0.89 g のポリ(4-(N-(5-カルボキシペンチル)ピリジニウム)-コ-4-ビニルピリジン)を加え、5 分間攪拌、さらに、0.1 mL の N,N-ジイソプロピルエチルアミンを加え、室温で 24 時間攪拌し、200 mL の酢酸エチルに加える。沈殿を濾過、回収し、30 mL のアセトニトリルに加え、40 mL の DOWEX (登録商標) 1X4、100 mL の水を加え、36 時間攪拌し、ポリマーを溶解させる。吸引濾過を行った後に、50 mL に濃縮し、分子量 10000 カットオフフィルタ (ミリポア) で、275 kPa の窒素圧で押し出す。さらに DOWEX (登録商標) 1X4 のカラムに水溶媒で通し、水中で透析を行い、化学式 (5) に示すポリマー (塩化物塩) を得る。

【0045】

【化5】



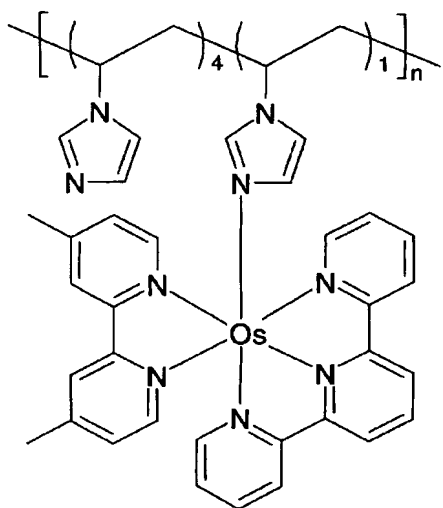
【 0 0 4 0 】

(調製例 9)

化学式(6)に示すオスミウム錯体ポリマーの合成法を記述する。6 mLの1-ビニルイミダゾールに0.5 gのアゾビスイソブチロニトリルを加え、アルゴン雰囲気下70℃で2時間反応をおこなう。反応溶液を空冷し、生じた沈殿物をメタノールに溶解させ、強攪拌中のアセトンに滴下し、沈殿を濾取し、ポリ-1-ビニルイミダゾールを得る。0.76 gの2,2':6',2''-ターピリジン、1.42 gの六塩化オスミウム酸アンモニウムを5 mLのエチレングリコールに加えアルゴン雰囲気下1時間還流をおこなう。さらに、この反应用液に0.60 gの4,4'-ジメチル-2,2'-ビピリジンを加えさらに24時間還流、反応溶液を空冷した後、不純物を濾取、濾液を減圧留去し、化学式(5)に示す、オスミウム(2,2':6',2''-ターピリジン)(4,4'-ジメチル-2,2'-ビピリジン)クロライド塩化物塩を得る。0.38 gの(2,2':6',2''-ターピリジン)(4,4'-ジメチル-2,2'-ビピリジン)クロライド塩化物塩と0.2 gのポリビニルイミダゾールに200 mLのエタノールを加え、窒素雰囲気下3日間還流をおこない、濾液を濾過した後、強攪拌中の1 Lジエチルエーテル中に滴下、生成した沈殿物を回収、乾燥し、化学式6に示すオスミウム錯体を得る。化合物の同定は、元素分析で行われる。

【 0 0 4 7 】

【化6】



.....(6)

【 0 0 4 8 】

(調製例 10)

FADを除去した、アボグルコースオキシダーゼの調製法について記述する。グルコースオキシダーゼ(*Aspergillus niger*)をグリセロールを30%含む0.25 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6、3 mL)に溶解する。溶液を0℃に冷却し、グリセロールを30%含むpH 1.1の0.025 Mリン酸ナトリウム緩衝液-硫酸溶液でpH 1.7に調整する。この溶液を(Sephadex (登録商標) G-25)カラムに、グリセロールを30%含む0.1 Mリン酸ナトリウム溶液(pH 1.7)を溶媒として通し、280 nmの波長で検知しながら回収する。デキストラン被覆チャコールを溶液に加え、1 Mの水酸化ナトリウム溶液を加えることで、pH 7に調整、その後4℃で1時間攪拌を行う。精製した溶液を遠心分離、0.45 μmのフィルタで濾過し、0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液を用いて透析を行い、アボグルコースオキシダーゼを得る。

(調製例 11)

FADを除去した、アボD-アミノ酸オキシダーゼの調製法について記述する。D-ア

ミノ酸オキシダーゼ（ノノ有職）を4して1Mの臭化カリウム、0.01Mのエチレンジアミン四酢酸を含む、0.1Mピロリン酸緩衝液（pH8.5）に対して、4回液を交換しながら2日間透析を行いホロD-アミノ酸オキシダーゼの色が消えるのを確認する。ついで、0.1Mピロリン酸緩衝液（pH8.5）に対して3回液を交換しながら2日間透析を行うことで、臭化カリウムを除きアボD-アミノ酸オキシダーゼを得る。

（調製例12）

PQQ修飾FADの調製法について記述する。1mMの調製例4に記載のN⁶-(2-アミノエチル)FAD、10mMの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの0.01MのHEPES緩衝液溶液（pH7.3）に、10mMのPQQを加え2時間攪拌し、限外濾過を行い過剰のPQQを除くことで、PQQ修飾FADを得る。

（調製例13）

フェロセン修飾FADの調製法について記述する。調製例12のPQQに代えて調製例5に記載のフェロセン誘導体を使用することで、フェロセン修飾FADを得る。

（調製例14）

PQQ修飾グルコースオキシダーゼの調製法について記述する。4mg/mLの調製例10に記載のアボグルコースオキシダーゼの0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に0.2mg/mLの調製例12に記載のPQQ修飾FADを加え、25℃で4時間、4℃で12時間攪拌、限外濾過を行うことで過剰のPQQ修飾FADを除去し、PQQ修飾グルコースオキシダーゼを調製する。

（調製例15）

フェロセン修飾グルコースオキシダーゼの調製法について記述する。調製例14のPQQ修飾FADに代えて調製例13に記載のフェロセン誘導体を使用することで、フェロセン修飾グルコースオキシダーゼを得る。

（調製例16）

フェロセン修飾D-アミノ酸オキシダーゼの調製法について記述する。調製例15の調製例10に記載のアボグルコースオキシダーゼに代えて調製例11に記載のアボアミノ酸オキシダーゼを使用することで、フェロセン修飾D-アミノ酸オキシダーゼを得る。

（調製例17）

燃料電池に用いるカソード用酵素電極の調製法について記述する。サンプル管中で5mLの水に、10mg/mLの濃度で調製例9に記載のオスミウムポリマーを溶解させ、0.2Mのクエン酸緩衝液（pH5）1mLに加え、さらに30mg/mLのラッカーゼ（*Coriolus hirsutus*）水溶液1mLを加える。攪拌した後、10mg/mLのポリエチレングリコールジグリシデルエーテル水溶液2mLを加え攪拌を行う。その後、ニッケル合金の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み0.5mm、金めっき厚0.5μm、空孔径50μm）を1cm角に切断、洗浄、UVオゾン処理を行ったものを先に用意した酵素、オスミウムポリマー溶液に浸漬し、引き上げ、デシケータ中で2日間乾燥させ、酵素電極を調製する。

【0049】

次に、本発明の酵素電極の作成法について記述する。

（実施例1）

サンプル管中で0.1Mの炭酸水素ナトリウム、調製例14に記載のPQQ修飾グルコースオキシダーゼの40mg/mL水溶液1mLを調製し、7mg/mLの過ヨウ酸ナトリウム水溶液0.5mLを加え暗所で1時間攪拌する。これに10%のポリビロールの水溶液を6mL、2.5mg/mLのポリエチレングリコールジグリシデルエーテル水溶液0.4mLに、0.42gのヘキサシアノ鉄（III）酸カリウムを加えたものに、金板（1cm角、厚さ0.3mm、ニラコ）を洗浄、UVオゾン処理を行ったものを浸漬し、引き上げ、デシケータ中で2日間乾燥させ、酵素電極を調製する。

（実施例2）

実施例1の10%ポリビロール溶液に代えて、10%ポリアニリン溶液を、0.42gのヘキサシアノ鉄（III）酸カリウムに代えて、0.63gのオクタシアノタングステ

ン（I V）酸カリウムを添加して使用すること、酵素電極を調製する。

（実施例3）

サンプル管中で0.1M炭酸水素ナトリウム、40mg/mLの調製例14に記載のPQQ修飾グルコースオキシダーゼの水溶液1mLを調製し、7mg/mLの過ヨウ酸ナトリウム水溶液0.5mLを加え暗所で1時間攪拌する。これに10mg/mLの調製例6に示すオスミウム錯体ポリマーの水溶液を6mL、2.5mg/mLのポリエチレングリコールジグリシデルエーテル0.4mLを加えたものに、金板（1cm角、厚さ0.3mm、ニラコ）を洗浄、UVオゾン処理を行ったものを浸漬し、引き上げ、デシケータ中で2日間乾燥させ、酵素電極を調製する。

（実施例4）

サンプル管中で0.1Mの炭酸水素ナトリウム、調製例14に記載のPQQ修飾グルコースオキシダーゼの40mg/mL水溶液1mLを調製し、7mg/mLの過ヨウ酸ナトリウム水溶液0.5mLを加え暗所で1時間攪拌する。これに4mg/mLの調製例6に記載のポリビニルイミダゾール水溶液を6mL、2.5mg/mLのポリエチレングリコールジグリシデルエーテル水溶液0.4mLに、0.42gのヘキサシアノ鉄（III）酸カリウムを加えたものに、金板（1cm角、厚さ0.3mm、ニラコ）を洗浄、UVオゾン処理を行ったものを浸漬し、引き上げ、デシケータ中で2日間乾燥させ、酵素電極を調製する。

【0050】

（実施例5）

実施例4の0.42gのヘキサシアノ鉄（III）酸カリウムに代えて、0.63gのオクタシアノタンゲステン（IV）酸カリウムを使用することで、酵素電極を調製する。

（実施例6）

実施例5のPQQ修飾グルコースオキシダーゼに代えて、調製例15に記載のフェロセン修飾グルコースオキシダーゼを使用することで、酵素電極を調製する。

（実施例7）

実施例6のフェロセン修飾グルコースオキシダーゼに代えて、調製例16に記載のフェロセン修飾アミノ酸オキシダーゼを使用することで、酵素電極を調製する。

（実施例8）

実施例4の調製例6に記載のポリビニルイミダゾールに代えて、ポリビニルピリジン（平均分子量15万）を使用することで、酵素電極を調製する。

（実施例9）

実施例5の調製例6に記載のポリビニルイミダゾール水溶液に代えて、ポリLリシン（平均分子量15万）を使用することで、酵素電極を調製する。

【0051】

（実施例10）

実施例3の調製例6に示すオスミウム錯体ポリマーに代えて、調製例7に記載の含フェロセンポリマーを使用することで、酵素電極を調製する。

（実施例11）

実施例1の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み0.5mm、金めっき厚0.5μm、空孔径50μm）を使用することで、酵素電極を調製する。

（実施例12）

実施例2の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み0.5mm、金めっき厚0.5μm、空孔径50μm）を使用することで、酵素電極を調製する。

（実施例13）

実施例3の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み0.5mm、金めっき厚0.5μm、空孔径50μm）を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 14)

実施例 4 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m）を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 15)

実施例 5 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m）を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 16)

実施例 6 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m）を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 17)

実施例 7 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m）を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 18)

実施例 8 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m）を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 19)

実施例 9 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m）を使用することで、酵素電極を調製する。

【0052】

(実施例 20)

実施例 10 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属（三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m）を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 21)

実施例 3 の金板に代えて、調製例 1 に記載の、ポリ（3、4-エチレンジオキシチオフェン）電極の空隙を有する導電性部材を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 22)

実施例 3 の金板に代えて、調製例 2 に記載の ITO 導電性部材を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 23)

実施例 3 の金板に代えて、フッ素ドーパ酸化スズの透明導電性ガラス（旭硝子、8 Ω /sq）を使用することで、酵素電極を調製する。

(実施例 24)

実施例 3 の金板に代えて、調製例 3 に示すグラファイトの空隙を有する導電性部材を使用することで、酵素電極を調製する。

【0053】

(比較例 1)

金板（1 cm 角、厚さ 0.3 mm、ニラコ）を、洗浄、UV オゾン処理を行ったものを 0.02 M のシスタミン水溶液に 2 時間浸漬し、引き上げ、水洗をおこないシスタミン修飾部材を調製する。3 mM の PQQ、10 mM の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの 0.01 M の HEPES 緩衝液溶液に、1 時間浸漬し、水洗することで PQQ 修飾を行う。1 mM の調製例 4 に記載の N⁶-(2-アミノエチル)FAD、10 mM の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの 0.01 M の HEPES 緩衝液溶液（pH 7.3）に、先の PQQ 修飾電極を 2 時間浸漬し、水洗する。

ことでPQQ修飾を行う。さらに4 IIIとIIIの調製例10に記載のノボホルコーヘオキシダーゼの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に25℃で4時間、4℃で12時間浸漬、引き上げ、リン酸緩衝液(pH7.0)中で一時間浸漬することで、酵素電極を調製する。

(比較例2)

実施例1の酵素溶液から、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを除いて酵素電極を調製する。

(比較例3)

実施例1の調製例14に記載のPQQ修飾グルコースオキシダーゼに代えて、グルコースオキシダーゼ(*Aspergillus niger*)を使用することで酵素電極を調製する。

(比較例4)

比較例2の10%ポリピロール溶液に代えて、10%ポリアニリン溶液を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例5)

比較例3の10%ポリピロール溶液に代えて、10%ポリアニリン溶液を、0.42gのヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムに代えて、0.63gのオクタシアノタングステン(IV)酸カリウムをそれぞれ使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例6)

実施例4の酵素溶液から、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを除いて酵素電極を調製する。

(比較例7)

実施例3の調製例14に記載のPQQ修飾グルコースオキシダーゼに代えて、グルコースオキシダーゼ(*Aspergillus niger*)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例8)

実施例4の調製例14に記載のPQQ修飾グルコースオキシダーゼに代えて、グルコースオキシダーゼ(*Aspergillus niger*)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例9)

実施例5の調製例14に記載のPQQ修飾グルコースオキシダーゼに代えて、グルコースオキシダーゼ(*Aspergillus niger*)を使用することで、酵素電極を調製する。

【0054】

(比較例10)

実施例6の酵素溶液から、オクタシアノタングステン(IV)酸カリウムを除いて酵素電極を調製する。

(比較例11)

実施例7の酵素溶液から、オクタシアノタングステン(IV)酸カリウムを除いて酵素電極を調製する。

(比較例12)

実施例7の調製例16に記載のフェロセン修飾アミノ酸オキシダーゼに代えて、D-アミノ酸オキシダーゼ(ブタ腎臓)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例13)

実施例3の調製例6に記載のオスミウム錯体ポリマーに代えて、調製例8のオスミウム錯体ポリマーを使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例14)

実施例4のヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムに代えて、ヘキサシアノマンガニ(III)酸カリウムを使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例15)

比較例 15 の調製例 14 に記載の P Q Q 修飾 グルコースオキシダーゼに代えて、調製例 15 に記載のフェロセン修飾 グルコースオキシダーゼを使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 16)

実施例 6 のオクタシアノタンゲステン (I V) 酸カリウムに代えて、ヘキサシアノマンガ (I I I) 酸カリウムを使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 17)

比較例 6 の調製例 6 に記載のポリビニルイミダゾールに代えて、ポリビニルピリジン (平均分子量 15 万) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 18)

比較例 8 の調製例 6 に記載のポリビニルイミダゾールに代えて、ポリビニルピリジン (平均分子量 15 万) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 19)

実施例 9 の酵素溶液から、オクタシアノタンゲステン (I V) 酸カリウムを除いて酵素電極を調製する。

【0055】

(比較例 20)

実施例 9 の調製例 14 に記載の P Q Q 修飾 グルコースオキシダーゼに代えて、グルコースオキシダーゼ (*Aspergillus niger*) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 21)

実施例 10 の調製例 14 に記載の P Q Q 修飾 グルコースオキシダーゼに代えて、グルコースオキシダーゼ (*Aspergillus niger*) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 22)

比較例 2 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属 (三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 23)

比較例 3 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属 (三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 24)

比較例 4 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属 (三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 25)

比較例 5 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属 (三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 26)

比較例 6 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属 (三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 27)

比較例 7 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属 (三菱マテリアル、含有元素 Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み 0.5 mm、金めっき厚 0.5 μ m、空孔径 50 μ m) を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例 28)

比較例 8 の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属 (三菱マテリアル、含有元素 Ni

、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例29)

比較例9の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

【0056】

(比較例30)

比較例10の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例31)

比較例11の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例32)

比較例12の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例33)

比較例13の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例34)

比較例14の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例35)

比較例15の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例36)

比較例16の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例37)

比較例17の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例38)

比較例18の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例39)

比較例19の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N i、C r、T i、N b、A l、M n、S i、C、厚み0.5 mm、金めっき厚0.5 μm、空孔径50 μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

【0057】

(比較例40)

比較例20の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素N

1、Cu、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み0.5mm、金めっき厚0.5μm、空孔径50μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例41)

比較例21の金板に代えて、ニッケル合金製の発泡金属(三菱マテリアル、含有元素Ni、Cr、Ti、Nb、Al、Mn、Si、C、厚み0.5mm、金めっき厚0.5μm、空孔径50μm)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例42)

実施例6の金板に代えて、調製例1に記載の、ポリ(3、4-エチレンジオキシチオフエン)電極の空隙を有する導電性部材を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例43)

実施例7の金板に代えて、調製例1に記載の、ポリ(3、4-エチレンジオキシチオフエン)電極の空隙を有する導電性部材を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例44)

実施例6の金板に代えて、調製例2に記載のITO導電性部材を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例45)

実施例7の金板に代えて、調製例2に記載のITO導電性部材を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例46)

実施例6の金板に代えて、フッ素ドーパ酸化スズの透明導電性ガラス(旭硝子、8Ω/sq)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例47)

実施例7の金板に代えて、フッ素ドーパ酸化スズの透明導電性ガラス(旭硝子、8Ω/sq)を使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例48)

実施例6の金板に代えて、調製例3に示すグラファイトの空隙を有する導電性部材使用することで、酵素電極を調製する。

(比較例49)

実施例7の金板に代えて、調製例3に示すグラファイトの空隙を有する導電性部材使用することで、酵素電極を調製する。

【0058】

(実施例50)

実施例1から24、比較例1から49に記載の酵素電極を使用して、センサを作成する。酵素電極にリードを取り付けたものを作用電極に、銀塩化銀電極を参照電極に、白金線を対極とした三極セル(図6)を使用し、電解質として、グルコースオキシダーゼを使用する酵素電極では、15mMのグルコース、0.1MのNaClを含む20mMのリン酸緩衝液(pH7.2)を使用、一方、D-アミノ酸オキシダーゼを使用する酵素電極では、15mMのD-アラニンを含む0.1Mのピロリン酸緩衝液(pH8.5)を使用する。測定は、それぞれの電極を、ポテンショスタット(東方技研、モデル2000)に接続し、窒素雰囲気下、作用電極に0.5V(vs Ag/AgCl)の電位を印加した際の定常電流を記録する。容器には、ウォータージャケットセルを使用し、測定温度は、恒温槽によって37℃にたもたれる。結果を表1に示す。

【0059】

表 1 (1)

酵素電極	電流密度 (基質添加前) $\mu A / cm^2$	電流密度 (基質添加後) $\mu A / cm^2$
実施例 1	4	5 6 0
実施例 2	7	5 2 0
実施例 3	7	9 5 0
実施例 4	7	7 2 0
実施例 5	4	6 9 0
実施例 6	7	6 3 0
実施例 7	2	1 5 0
実施例 8	1	5 4 0
実施例 9	8	5 4 0
実施例 1 0	9	4 6 0
実施例 1 1	5 1	4 1 0 0
実施例 1 2	5 6	3 5 0 0
実施例 1 3	6 1	7 5 0 0
実施例 1 4	5 9	5 2 0 0
実施例 1 5	5 6	5 5 0 0
実施例 1 6	4 2	4 6 0 0
実施例 1 7	1 3	1 1 0 0
実施例 1 8	1 1	3 6 0 0
実施例 1 9	2 8	4 0 0 0
実施例 2 0	6 9	3 7 0 0
実施例 2 1	1 5	4 8 0 0
実施例 2 2	2 6	2 8 0 0
実施例 2 3	1 6	1 5 0 0
実施例 2 4	1 5	1 1 0 0

表 1 (2)

酵素電極	電流密度 (基質添加前) $\mu A / cm^2$	電流密度 (基質添加後) $\mu A / cm^2$
比較例 1	1	1 5 0
比較例 2	2	1 6 0
比較例 3	1	9 8
比較例 4	1	1 4 0
比較例 5	0	1 7 0
比較例 6	1	4 6
比較例 7	1	3 5 0
比較例 8	2	2 8 0
比較例 9	6	3 2 0
比較例 1 0	0	2 8
比較例 1 1	0	5
比較例 1 2	1	9 5
比較例 1 3	0	0
比較例 1 4	0	0
比較例 1 5	0	0
比較例 1 6	0	0
比較例 1 7	1	4 9
比較例 1 8	1	1 8 0
比較例 1 9	1	3 9
比較例 2 0	4	2 3 0
比較例 2 1	3	1 9 0
比較例 2 2	5	1 1 0 0
比較例 2 3	8	1 4 0 0
比較例 2 4	5	9 5 0
比較例 2 5	1 8	1 2 0 0

表 1 (3)

酵素電極	電流密度 (基質添加前) $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	電流密度 (基質添加後) $\mu\text{A}/\text{cm}^2$
比較例 26	3	360
比較例 27	36	2400
比較例 28	5	1900
比較例 29	3	2100
比較例 30	3	220
比較例 31	0	37
比較例 32	10	740
比較例 33	0	0
比較例 34	0	0
比較例 35	0	0
比較例 36	0	0
比較例 37	4	360
比較例 38	14	1400
比較例 39	2	280
比較例 40	36	1800
比較例 41	21	1400
比較例 42	2	240
比較例 43	18	1700
比較例 44	1	140
比較例 45	12	1100
比較例 46	1	72
比較例 47	5	530
比較例 48	0	56
比較例 49	8	430

【 0 0 6 2 】

実施例 1 から 24 に記載の、酵素と電子の受け渡しを行うための第 1 のメディエータと、第 1 のメディエータと電子の受け渡しを行うための第 2 のメディエータを用いた酵素電極を用いたセンサは、いずれも対応する導電性部材、担体、酵素を用いた酵素電極よりも高い電流密度を示す。これは、第 1 のメディエータの導入により、酵素／メディエータ間の電子移動速度が向上し、かつ、包括固定化を行うことにより導電性部材に固定化された酵素の密度が向上したためであると考えられる。一方、比較例 13－16 の酵素電極で使用した、第 2 のメディエータの酸化還元電位は、文献値よりそれぞれ、 $-0.19\text{ V (vs Ag/AgCl)}$ 、実施例 13, 15)、 $-1.02\text{ V (vs Ag/AgCl)}$ 、実施例 14, 16) であり、それぞれ対応する第 1 のメディエータの電位 (最も負のもので $-0.14\text{ V vs Ag/AgCl}$) よりも負に位置するため、メディエータ 1／メディエータ 2 間の電子移動が行われず、低い電流密度を示すものと考えられる。このことから、酵素と電子の受け渡しを行うための第 1 のメディエータと、第 1 のメディエータと電子の受け渡しを行うための第 2 のメディエータを用いた酵素電極の導入により、センサを高感度化可能なことが確認される。

【 0 0 6 3 】

(実施例 51)

実施例 1 から 24、比較例 1 から 49 に記載の酵素電極を使用して、燃料電池を作成する。酵素電極にリードを取り付けたものを作用電極に、調製例 17 に記載の酵素電極を対極とし、両電極間に多孔質ポリプロピレンフィルム (厚さ $20\text{ }\mu\text{m}$) を挟んだ二極セル構成 (図 7) で、電解質として、 0.2 M クエン酸緩衝液 ($\text{pH} 5.0$) を用い、アノード燃料として、グルコースオキシダーゼを使用する酵素電極を用いるセルでは、 15 mM のグルコースを、D-アミノ酸オキシダーゼを使用する酵素電極を用いるセルでは、 15 m

IMのドーパント、カソード材料として、飽和の酸系を用いて調定を行う。調定は、それぞれの電極を、ポテンシオスタット（東方技研、モデル2000）に接続し、 -1.2 V から 0.1 V まで 1 mV/秒 の速度で電圧を変化させ、電圧－電流特性を測定する。容器には、ウォータージャケットセルを使用し、測定温度は、恒温槽によって 37°C にたもたれる。結果を表2に示す。

【0064】

【表4】

表2（1）

アノード	カソード	短絡電流密度 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	最大出力 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
実施例1	調製例17	450	53
実施例2	調製例17	420	17
実施例3	調製例17	760	231
実施例4	調製例17	580	76
実施例5	調製例17	550	22
実施例6	調製例17	500	20
実施例7	調製例17	120	5
実施例8	調製例17	430	56
実施例9	調製例17	430	18
実施例10	調製例17	370	78
実施例11	調製例17	3000	317
実施例12	調製例17	2800	100
実施例13	調製例17	3000	818
実施例14	調製例17	3000	320
実施例15	調製例17	3000	111
実施例16	調製例17	3000	112
実施例17	調製例17	870	32
実施例18	調製例17	2900	324
実施例19	調製例17	3000	112
実施例20	調製例17	2900	555
実施例21	調製例17	3000	403
実施例22	調製例17	2300	557
実施例23	調製例17	1200	237
実施例24	調製例17	870	49

【0065】

表 2 (2)

アノード	カソード	短絡電流密度 $\mu A / cm^2$	最大出力 $\mu W / cm^2$
比較例 1	調製例 1 7	1 2 0	5 4
比較例 2	調製例 1 7	1 3 0	5 7
比較例 3	調製例 1 7	7 9	1 0
比較例 4	調製例 1 7	1 1 0	4 9
比較例 5	調製例 1 7	1 4 0	6
比較例 6	調製例 1 7	3 7	1 6
比較例 7	調製例 1 7	2 8 0	8 4
比較例 8	調製例 1 7	2 2 0	2 6
比較例 9	調製例 1 7	2 6 0	1 1
比較例 1 0	調製例 1 7	2 2	2
比較例 1 1	調製例 1 7	4	0
比較例 1 2	調製例 1 7	7 6	3
比較例 1 3	調製例 1 7	0	0
比較例 1 4	調製例 1 7	0	0
比較例 1 5	調製例 1 7	0	0
比較例 1 6	調製例 1 7	0	0
比較例 1 7	調製例 1 7	3 9	1 8
比較例 1 8	調製例 1 7	1 5 0	1 8
比較例 1 9	調製例 1 7	3 1	1 4
比較例 2 0	調製例 1 7	1 8 0	8
比較例 2 1	調製例 1 7	1 5 0	3 2
比較例 2 2	調製例 1 7	8 9 0	3 5 4
比較例 2 3	調製例 1 7	1 1 0 0	1 2 0
比較例 2 4	調製例 1 7	7 6 0	3 1 5
比較例 2 5	調製例 1 7	9 6 0	3 6

表 2 (3)

アノード	カソード	短絡電流密度 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	最大出力 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
比較例 2 6	調製例 1 7	2 9 0	1 1 9
比較例 2 7	調製例 1 7	1 9 0 0	5 2 3
比較例 2 8	調製例 1 7	1 5 0 0	1 6 4
比較例 2 9	調製例 1 7	1 7 0 0	6 0
比較例 3 0	調製例 1 7	1 8 0	1 2
比較例 3 1	調製例 1 7	2 9	2
比較例 3 2	調製例 1 7	5 9 0	2 2
比較例 3 3	調製例 1 7	0	0
比較例 3 4	調製例 1 7	0	0
比較例 3 5	調製例 1 7	0	0
比較例 3 6	調製例 1 7	0	0
比較例 3 7	調製例 1 7	2 9 0	1 1 4
比較例 3 8	調製例 1 7	1 2 0 0	1 3 2
比較例 3 9	調製例 1 7	2 3 0	9 6
比較例 4 0	調製例 1 7	1 4 0 0	5 6
比較例 4 1	調製例 1 7	1 1 0 0	1 9 4
比較例 4 2	調製例 1 7	1 9 0	4 1
比較例 4 3	調製例 1 7	1 4 0 0	1 9 0
比較例 4 4	調製例 1 7	1 2 0	3 9
比較例 4 5	調製例 1 7	8 5 0	2 0 8
比較例 4 6	調製例 1 7	5 8	1 7
比較例 4 7	調製例 1 7	4 3 0	8 7
比較例 4 8	調製例 1 7	4 5	4
比較例 4 9	調製例 1 7	3 4 0	1 8

【 0 0 6 7 】

実施例 1 から 2 4 に記載の酵素と電子の受け渡しを行うための第 1 のメディエータと、第 1 のメディエータと電子の受け渡しを行うための第 2 のメディエータを用いた酵素電極を用いた燃料電池は、いずれも対応する導電性部材、担体、酵素を用いた酵素電極よりも高い短絡電流密度を示す。これは、第 1 のメディエータの導入により、酵素／メディエータ間の電子移動速度が向上し、かつ、包括固定化を行うことにより導電性部材に固定化された酵素の密度が向上したためであると考えられる。一方、比較例 1 3－1 6 の酵素電極で使用した、第 2 のメディエータの酸化還元電位は、文献値よりそれぞれ、 -0.19 V ($\text{vs Ag}/\text{AgCl}$ 、比較例 1 3, 1 5)、 -1.02 V ($\text{vs Ag}/\text{AgCl}$ 、比較例 1 4, 1 6) であり、それぞれ対応するメディエータの電位（最も負のもので $-0.14\text{ V vs Ag}/\text{AgCl}$ ）よりも負に位置するため、メディエータ 1／メディエータ 2 間の電子移動が行われず、低い電流密度を示すものと考えられる。最大出力に関しては、複数種のメディエータを使用することで、電圧のロスが生じるため、一部の実施例に記載の酵素電極を用いた燃料電池においては、対応する導電性部材、担体、酵素を用いた比較例に記載の酵素電極を用いた燃料電池よりも低い出力を示すものもある。しかし、全体的には、実施例に記載の酵素電極を用いた燃料電池においては、対応する導電性部材、担体、酵素を用いた比較例に記載の酵素電極を用いた燃料電池よりも高い出力を示し、このことから、酵素と電子の受け渡しを行うための第 1 のメディエータと、第 1 のメディエータと電子の受け渡しを行うための第 2 のメディエータを用いたの導入により、燃料電池を高出力化可能なことが確認される。

【 0 0 6 8 】

(実施例 5 2)

実施例 1 から 2 4、比較例 1 から 4 9 に記載の酵素電極を使用して、電気化学反応装置

で構成する。酵素電極を計測電極に、銀塩化銀電極を参照電極に、白金棒を対極とした一極セル（図6）を使用し、0.1M NaCl、20mMリン酸緩衝液（pH7.2）、10mMのグルコース、10mMのD-アラニンを含む電解液を使用し、ウォータージャケットセル中窒素雰囲気下0.4V vs Ag/AgClの電位を100分間印加し、生成物を高速液体クロマトグラフィーで定量する。結果を表3に示す。

【0069】

【表7】

表3 (1)

酵素電極	反応電荷量/mC	検出物質	検出量/ μmol
実施例1	3200	グルコノラクトン	32
実施例2	2900	グルコノラクトン	30
実施例3	5400	グルコノラクトン	56
実施例4	4000	グルコノラクトン	41
実施例5	4100	グルコノラクトン	41
実施例6	3400	グルコノラクトン	37
実施例7	800	ビルビン酸	8
実施例8	2900	グルコノラクトン	32
実施例9	3200	グルコノラクトン	34
実施例10	2600	グルコノラクトン	27
実施例11	25000	グルコノラクトン	250
実施例12	21000	グルコノラクトン	210
実施例13	44000	グルコノラクトン	450
実施例14	29000	グルコノラクトン	310
実施例15	30000	グルコノラクトン	300
実施例16	26000	グルコノラクトン	280
実施例17	6300	ビルビン酸	64
実施例18	20000	グルコノラクトン	200
実施例19	22000	グルコノラクトン	230
実施例20	20000	グルコノラクトン	210
実施例21	28000	グルコノラクトン	290
実施例22	15000	グルコノラクトン	170
実施例23	7900	グルコノラクトン	86
実施例24	6300	グルコノラクトン	65

【0070】

表3 (2)

酵素電極	反応電荷量/mC	検出物質	検出量/ μmol
比較例1	830	グルコノラクトン	9
比較例2	880	グルコノラクトン	9
比較例3	550	グルコノラクトン	6
比較例4	770	グルコノラクトン	8
比較例5	940	グルコノラクトン	10
比較例6	260	グルコノラクトン	3
比較例7	2000	グルコノラクトン	21
比較例8	1600	グルコノラクトン	16
比較例9	1900	グルコノラクトン	21
比較例10	160	グルコノラクトン	2
比較例11	26	ピルビン酸	0
比較例12	540	ピルビン酸	6
比較例13	0	グルコノラクトン	0
比較例14	0	グルコノラクトン	0
比較例15	0	グルコノラクトン	0
比較例16	0	グルコノラクトン	0
比較例17	270	グルコノラクトン	3
比較例18	1000	グルコノラクトン	11
比較例19	210	グルコノラクトン	2
比較例20	1300	グルコノラクトン	13
比較例21	1100	グルコノラクトン	12
比較例22	6700	グルコノラクトン	71
比較例23	8100	グルコノラクトン	88
比較例24	5200	グルコノラクトン	54
比較例25	7100	グルコノラクトン	77

表 3 (3)

酵素電極	反応電荷量/mC	検出物質	検出量/ μmol
比較例 2 6	2 0 0 0	グルコノラクトン	2 2
比較例 2 7	1 4 0 0 0	グルコノラクトン	1 5 0
比較例 2 8	1 1 0 0 0	グルコノラクトン	1 1 0
比較例 2 9	1 2 0 0 0	グルコノラクトン	1 2 0
比較例 3 0	1 3 0 0	グルコノラクトン	1 3
比較例 3 1	2 2 0	ビルビン酸	2
比較例 3 2	4 0 0 0	ビルビン酸	4 1
比較例 3 3	0	グルコノラクトン	0
比較例 3 4	0	グルコノラクトン	0
比較例 3 5	0	グルコノラクトン	0
比較例 3 6	0	グルコノラクトン	0
比較例 3 7	2 1 0 0	グルコノラクトン	2 2
比較例 3 8	8 1 0 0	グルコノラクトン	8 4
比較例 3 9	1 6 0 0	グルコノラクトン	1 6
比較例 4 0	1 0 0 0 0	グルコノラクトン	1 1 0
比較例 4 1	8 0 0 0	グルコノラクトン	8 6
比較例 4 2	1 5 0 0	グルコノラクトン	1 5
比較例 4 3	9 9 0 0	グルコノラクトン	9 8
比較例 4 4	8 5 0	グルコノラクトン	9
比較例 4 5	6 0 0 0	グルコノラクトン	6 4
比較例 4 6	4 1 0	グルコノラクトン	4
比較例 4 7	3 1 0 0	グルコノラクトン	3 2
比較例 4 8	3 1 0	グルコノラクトン	3
比較例 4 9	2 5 0 0	グルコノラクトン	2 7

【 0 0 7 2 】

反応電解液からは、比較例 1 3 - 1 6 の酵素電極を使用した電気化学反応装置を除き、グルコースを基質とする酵素を使用する酵素電極を用いた反応装置の反応液からは、グルコノラクトンが検出され、ビルビン酸は検出されず、D-アラニンを経質とする酵素を使用する酵素電極を用いた反応装置の反応液からはビルビン酸が検出され、グルコノラクトンは検出されず、いずれの酵素電極を用いた反応装置においても、基質選択的に反応が進行していることがわかる。一方、比較例 1 3 - 1 6 で使用した、第 2 のメディエータの酸化還元電位は、文献値よりそれぞれ、 $-0.19\text{ V (vs Ag/AgCl)}$ 、比較例 1 3, 1 5)、 $-1.02\text{ V (vs Ag/AgCl)}$ 、比較例 1 4, 1 6)であり、それぞれ対応するメディエータの電位(最も負のもので $-0.14\text{ V vs Ag/AgCl}$)よりも負に位置するため、メディエータ 1 / 2 間の電子移動が行われず、低い電荷量を示すものと考えられる。このことから、酵素と電子の受け渡しを行うための第 1 のメディエータと、第 1 のメディエータと電子の受け渡しを行うための第 2 のメディエータを用いたの導入により、電気化学反応装置における反応を高速化を高感度化可能なことが確認される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 3 】

【 図 1 】 包括法の酵素電極の概念図

【 図 2 】 共有結合法の酵素電極の概念図

【 図 3 】 本発明の酵素電極の概念図

【 図 4 】 本発明のメディエータの電位関係の概念図 (陽極または負極)

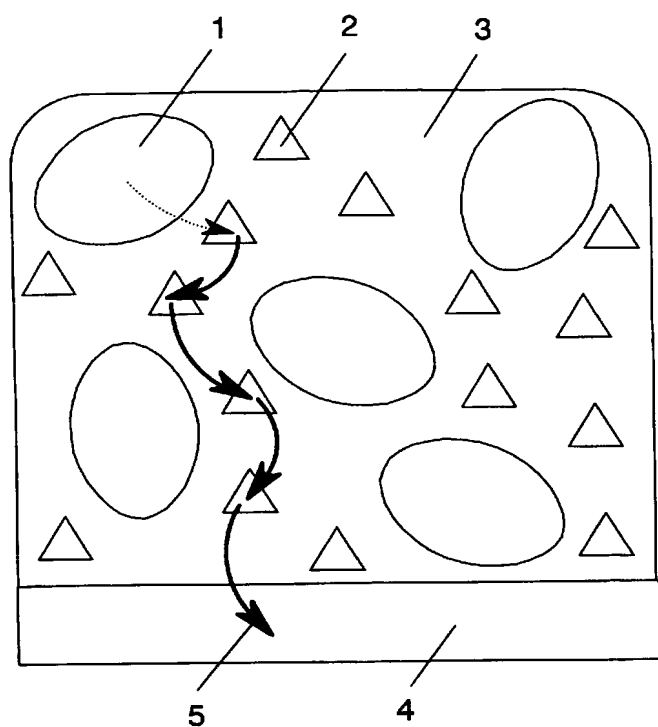
【 図 5 】 本発明のメディエータの電位関係の概念図 (陰極または正極)

【 図 6 】 三極セルの説明図

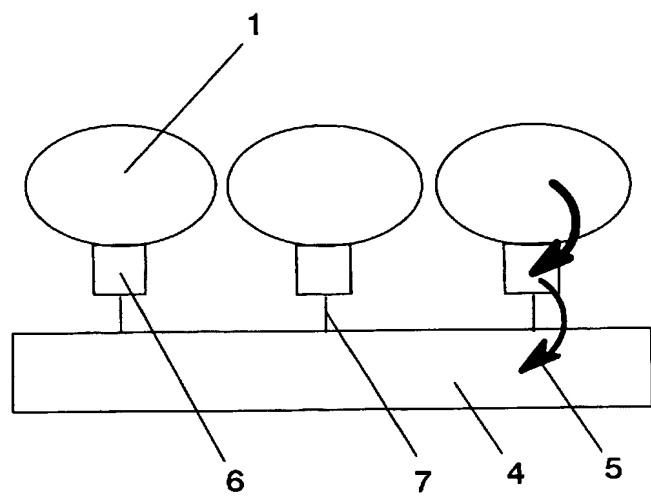
【 図 7 】 二極セルの説明図

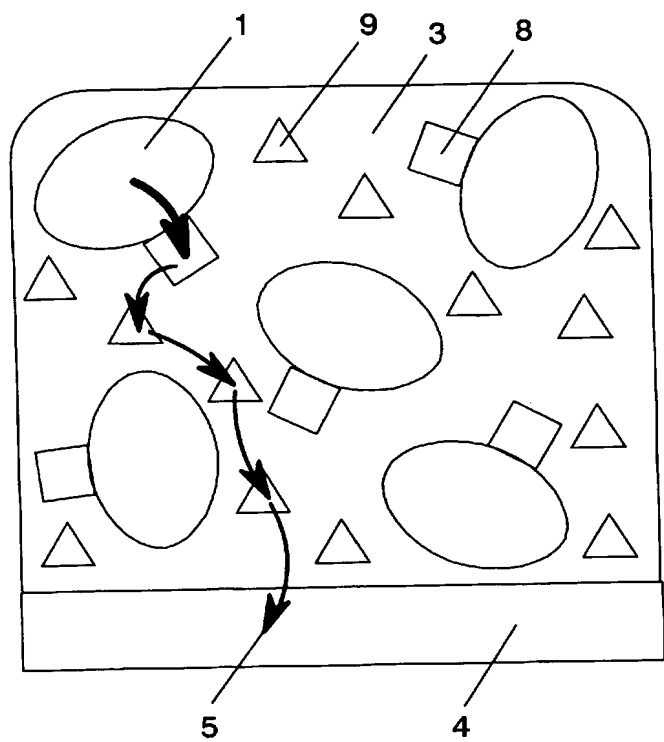
- 1 酵素
- 2 メディエータ
- 3 担体
- 4 導電性部材
- 5 電荷の流れ
- 6 メディエータ
- 7 担体
- 8 第1のメディエータ
- 9 第2のメディエータ
- 10 電子の流れ
- 11 電位（矢印の向きが負）
- 12 ウォータージャケットセル
- 13 ウォータージャケットセルのフタ
- 14 電解液
- 15 アノード（陽極、負極）
- 16 白金線電極
- 17 銀塩化銀参照電極
- 18 アノードリード
- 19 カソードリード
- 20 参照電極リード
- 21 ポテンシオスタット
- 22 ガス吹込口
- 23 ガスチューブ
- 24 温調水流入口
- 25 温調水排出口
- 26 多孔質ポリプロピレンフィルム
- 27 カソード

【図 1】

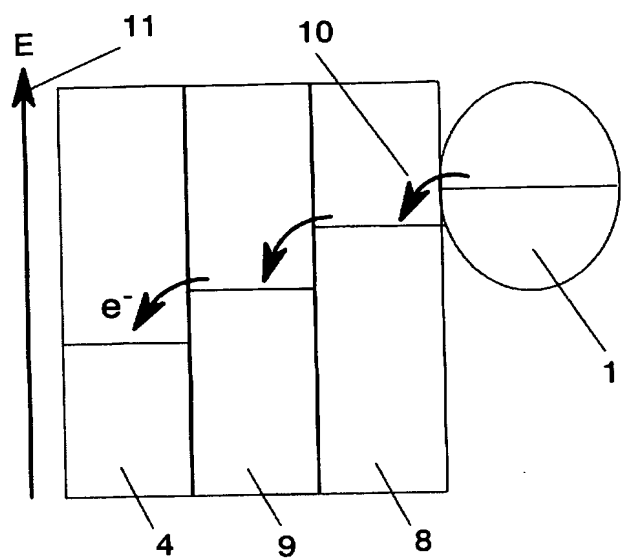


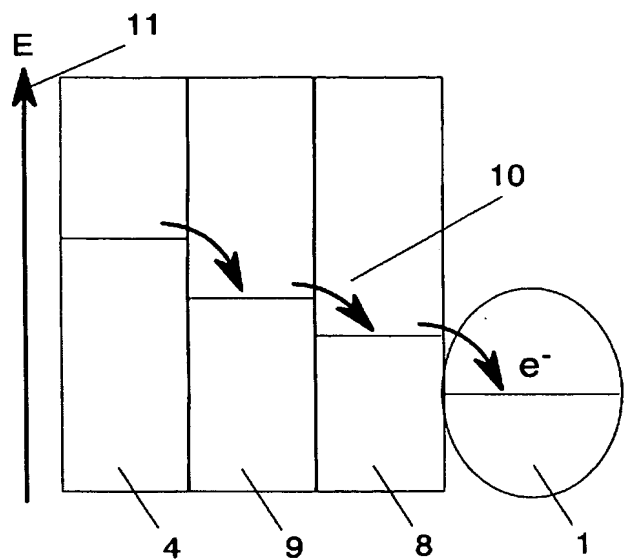
【図 2】



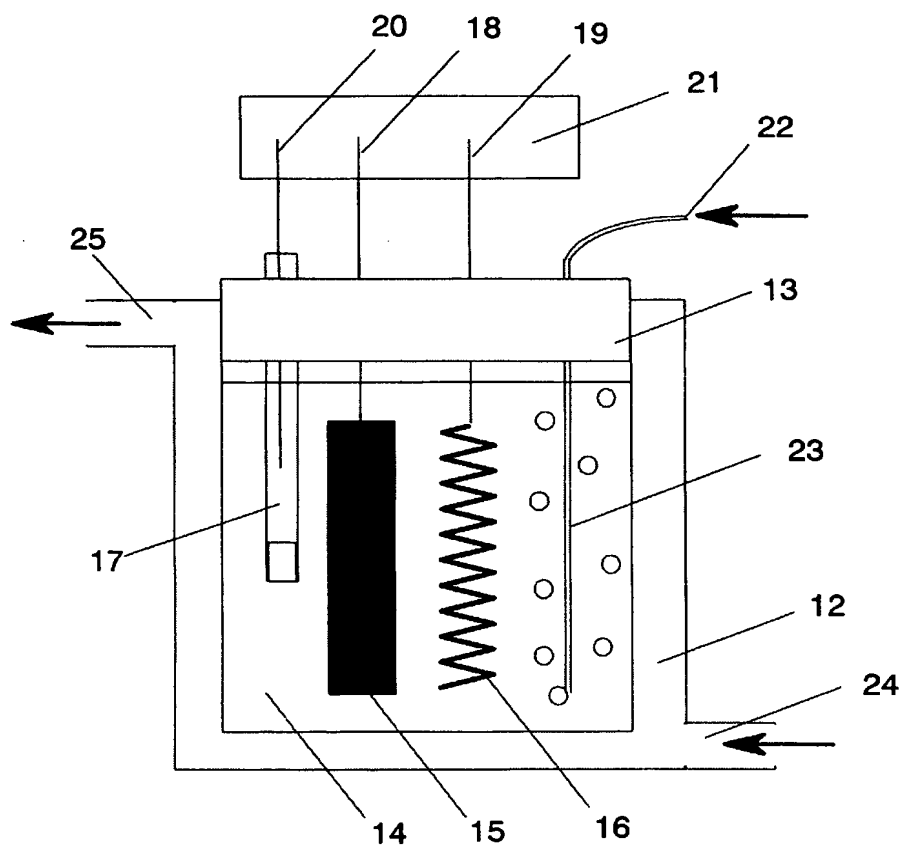


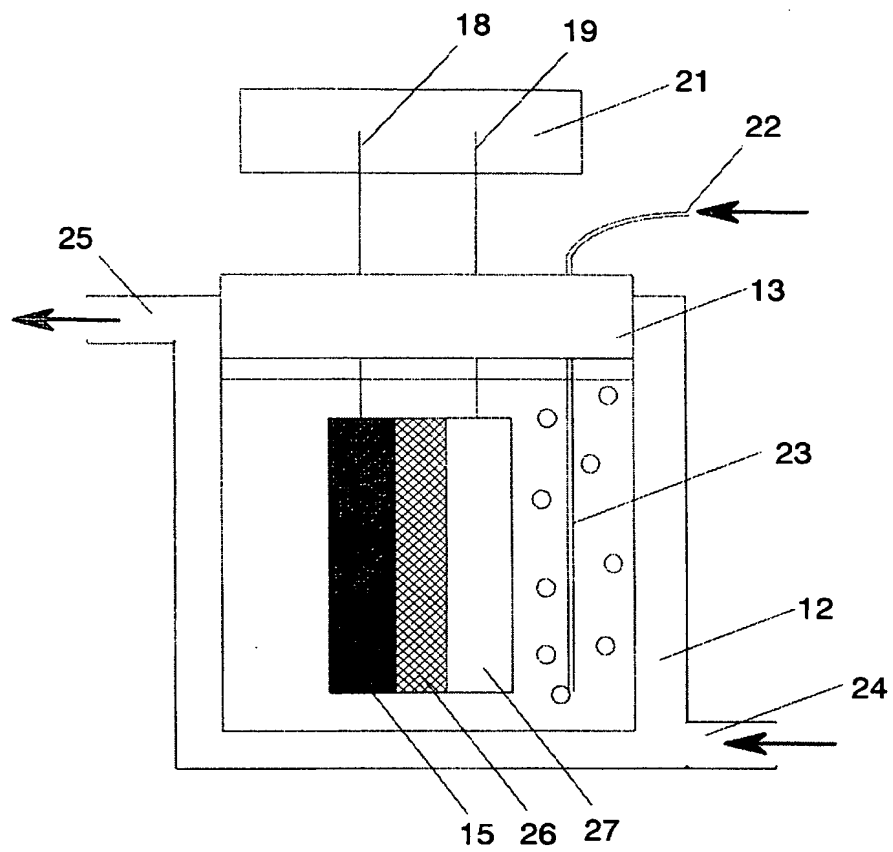
【图 4】





【圖 6】





【要 約】

【課題】 高密度で酵素を担持可能であり、かつ電流密度の向上を図ることができる酵素電極を提供すること。

【解決手段】 酵素と、酵素との電子の受け渡しを行うための第1のメディエータを少なくとも一種類と、第1のメディエータとの電子の受け渡しを行うための第2のメディエータを少なくとも一種類と、を担体を介して前記第1のメディエータ及び前記第2のメディエータの少なくとも一方との電子の受け渡しを行うための導電性部材に固定して、センサ、燃料電池、電気化学反応装置などの電極として有用である酵素電極を得る。

【選択図】 なし

0 0 0 0 0 1 0 0 7

19900830

新規登録

5 9 5 0 1 7 8 5 0

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

キャノン株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/013907

International filing date: 22 July 2005 (22.07.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-216377
Filing date: 23 July 2004 (23.07.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 25 August 2005 (25.08.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.